

DETERMINACIONES HORMONALES

M.C.Gobello¹, O.A.Brown², J.R.Rondero²

¹Cátedra. de Clínica Médica de Pequeños animales. Facultad de Ciencias Veterinarias

²INIBIOLP- Cátedra de Histología B. Facultad de Ciencias Médicas

RESUMEN: Los inmunoensayos (IE) se definen como un conjunto de técnicas analíticas que usan anticuerpos para la determinación selectiva de ciertos componentes de interés presentes en muestras biológicas. Estos ensayos son altamente selectivos, de bajos límites de detección, relativamente económicos y fáciles de realizar. Por estas razones, los IE constituyen los métodos de elección para múltiples aplicaciones endocrinológicas, tanto en medicina humana como veterinaria. En este trabajo se exponen los principios generales de las determinaciones hormonales, así como también se explican algunos de los IE disponibles para las determinaciones hormonales en los caninos domésticos. Por último, se incluye una breve discusión sobre la situación actual y la relevancia de los IE caninos en la endocrinología clínica veterinaria.

PALABRAS CLAVE: inmunoensayo, hormona, perro.

HORMONAL DETERMINATIONS

ABSTRACT: Immunoassays (IA) are defined as analytical techniques which use antibodies for selective determinations of sample components. The main advantages of IA are that they are highly selective, relatively inexpensive, easy to perform and that they have low limits of detection. All these characteristics make IA the methods of choice for human and veterinary endocrinological applications. General principles of hormonal determinations and some of the available canine IA are described. The relevance and present state of canine IA in endocrinological clinical practice are also briefly discussed.

KEY WORDS: immunoassay, hormone, dog

INTRODUCCIÓN

Los inmunoensayos (IE) constituyen uno de los métodos más poderosos y ampliamente usados en la química clínica. Un IE se define como una técnica analítica que usa anticuerpos (Ac), para la determinación selectiva de compuestos presentes en muestras biológicas. Las principales ventajas de los IE consisten en que son altamente selectivos, tienen bajos límites de detección y en que pueden ser adaptados para la determinación de muchos compuestos de interés clínico (Hage, 1993). Por su alta selectividad los IE pueden ser usados en muestras complejas, como orina o sangre, con poca o ninguna preparación de la muestra. Estos métodos son, también, relativamente económicos y una vez puestos a punto fáciles de realizar. Todas estas características hacen que los IE sean los métodos de elección para múltiples aplicaciones endocrinológicas, tanto en medicina humana como veterinaria.

Este trabajo intenta dar a conocer los principios generales de las distintas metodologías utilizadas para las determinaciones hormonales, así como también mencionar algunos de los IE disponibles en la actualidad para ser usados en los caninos domésticos.

PRINCIPIO Y CLASIFICACIÓN

El principio de todas estas pruebas consiste en la combinación de proteínas de alta sensibilidad y especificidad (Ac) con los ligandos (antígenos [Ag]) a dosar según la siguiente ecuación:



Siendo Ag el antígeno o ligando a dosar, Ac el anticuerpo específico que reacciona con el antígeno, AgAc el complejo antígeno anticuerpo generado y K la constante de equilibrio de la reacción.

Los IE se pueden clasificar de acuerdo a:

1) El tipo de marca (sustancia que se incorpora a una molécula a fin de poder identificarla) en:

-Radioinmunomarcados: los dos más frecuentemente usados son el radioinmunoensayo (RIE) de competición y los ensayos inmunoradiométricos (IRMA) que utilizan isótopos radioactivos.

-Enzimáticos: en este caso la marca es una enzima. Ejemplos de estos ensayos son el enzoinmunoensayo de competición (EIA), el ensayo inmunoabsorbido a enzimas o enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), el inmunotest-enzimomonitorado (EMIT) y los test inmunoenzimométricos (IEMA)

-De fluorescencia: basados en marcas fluorescentes, por ejemplo el fluoroinmunoensayo (FIA) y el inmunofluorométrico (IFMA).

2)La concentración de sus reactivos en:

-IE de competición: en los cuales los Ac son usados en una concentración limitada con un antígeno (Ag) marcado.

-Inmunométricos: en los cuales los Ac están marcados y en exceso (Bianchi y Marpes, 1982; Eduards, 1990).

Se pueden explicar los IE tomando como modelo de descripción el RIE, diciendo que la sustancia por valorar (ligando) compete cuantitativamente por la unión a un reactivo específico (Ac) con la misma sustancia marcada con un isótopo radioactivo (Ag*).

Si se hace reaccionar el Ac con el compuesto marcado (Ag*) y parte de éste se une al Ac, formando el complejo AcAg*, parte del Ag* queda libre (Fig. N° I).

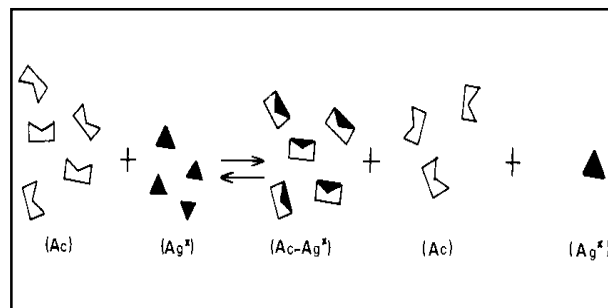


Figura N°I: Principios del radioinmunoanálisis. Unión inicial.

En un nuevo sistema en el que se encuentra el Ag marcado (Ag*) y el compuesto por valorar (Ag), se producirá una competencia entre el Ag y el Ag* por los sitios de unión específicos del Ac los cuales son bivalentes. Por consiguiente aumentará el número de moléculas marcadas libres (Fig. N° II).

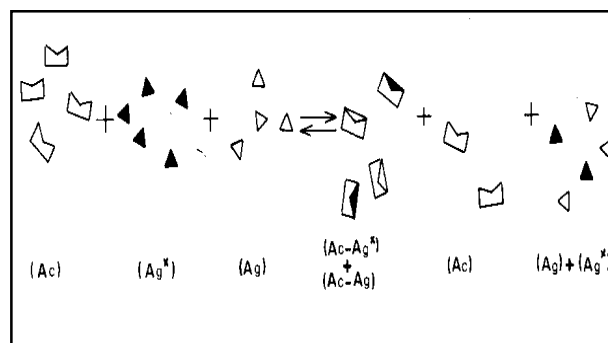


Figura N°II: Unión competitiva, dosis 1.

A medida que aumenta la concentración de la sustancia por valorar, la concentración de Ag^* no unido al Ac se incrementa (Fig. N° III).

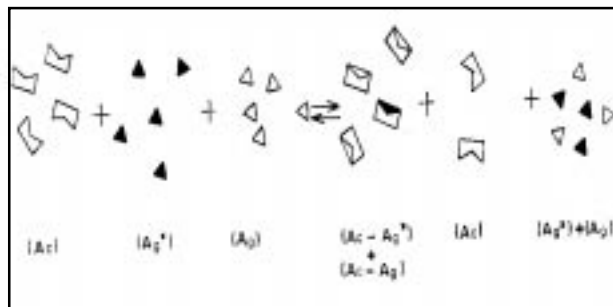


Figura N°III: Unión competitiva, dosis 2.

Si las cantidades del ligando marcado y Ac son fijas y limitadas y hay cantidades crecientes de ligando sin marcar, la cantidad relativa de compuesto marcado que está unido al Ac disminuye cuando la concentración del compuesto sin marcar presente en la reacción aumenta. Si se separan cuantitativamente el compuesto unido al Ac del compuesto libre, se pueden determinar sus respectivas actividades aparentes (radioactividad) expresadas en cuentas por minuto (cpm). Estos resultados pueden analizarse de distintas formas de ajustes matemáticos (curvas dosis-respuesta). El cociente de las fracciones unida al Ac (B) versus la fracción libre de Ag^* (F) permite la construcción de dichas curvas estándar donde B/F (actividad del marcador unido en relación al libre) o %B (total de la actividad del marcador) o cualquier otro índice de partición entre lo unido y lo libre se grafica en el eje de las ordenadas y la concentración del ligando no unido en el de las abscisas. El desplazamiento de la actividad del trazador producida por una cantidad desconocida de ligando no marcado de la muestra a medir, se interpola en la curva estándar y de esta manera puede ser evaluada su concentración (Travis, 1979).

El principio básico del desplazamiento debido a la dosis del marcador unido se explica en la figura 4 y se aplica a todo IE de competición. En cada tubo (A, B, C, D) el número de moléculas de marcador es constante y está en exceso en relación al número también constante pero limitado de sitios de unión por tubo. En ausencia de ligando no marcado la unión de la radioactividad es máxima y se la llama unión máxima (B_0), la situación hipotética de %B=50 es graficada como A en la curva. El %B en ausencia de ligando no marcado se lo llama % B_0 o alternativamente B_0 . En B se agregan 4 moléculas de ligando no marcado al sistema, entonces B/F en equilibrio es 0,6 o 3/5. Con la adi-

ción de 4 moléculas más (C) del ligando no marcado implica que el 50% del ligando presente está marcado y, consecuentemente el 50% de los sitios de unión disponibles serán ocupados por el ligando marcado. En esta situación, B/F es igual al 0,33 o 2/6. La adición de 24 moléculas de ligando no marcado en D significa que 1 de 4 moléculas de ligando está marcada y por eso, B/F es 0,14 o 1/7. Solamente 1 de 4 sitios de unión está ocupado por el trazador.

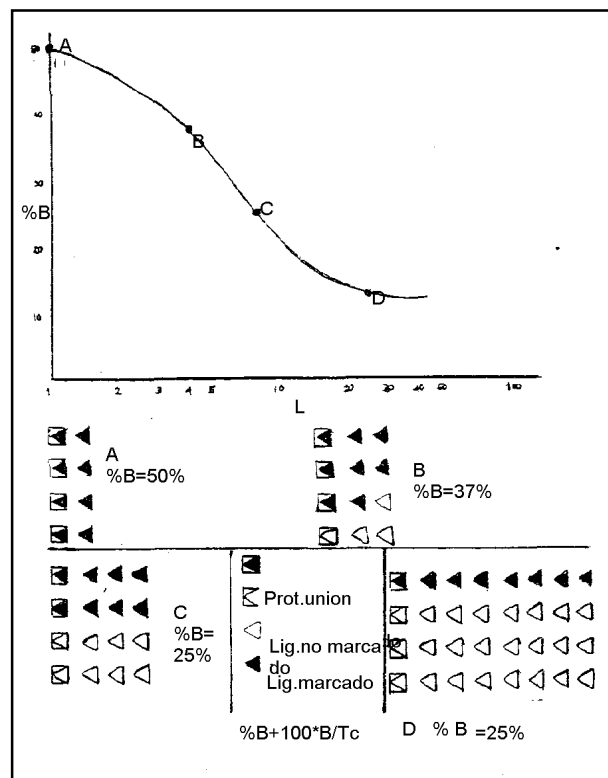


Figura N°IV: Principio del desplazamiento dependiente de la dosis del marcador unido.

En la literatura los datos son frecuentemente graficados en algunas de las tres formas de la Figura V, las cuales son todas aceptables (Figura N° V).

En A y B la ordenada puede ser calculada como B/F, %B (del total), $\%B/B_0$, o B/T, siendo T el número de cuentas totales por minuto (cpm) de cada tubo, todas producen curvas que son inversamente proporcionales a la cantidad del ligando no marcado agregado. La graficación logit en C resulta en una línea recta que requiere "papel logit-log".

La transformación es la siguiente :

$$\text{Logit } (B/B_0) = \log \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$$

resultando ser engorrosa para un cálculo manual sin la ayuda de computadoras. En una graficación lineal se obtiene una buena aproximación de la función logit cuando B/B_0 se gra-

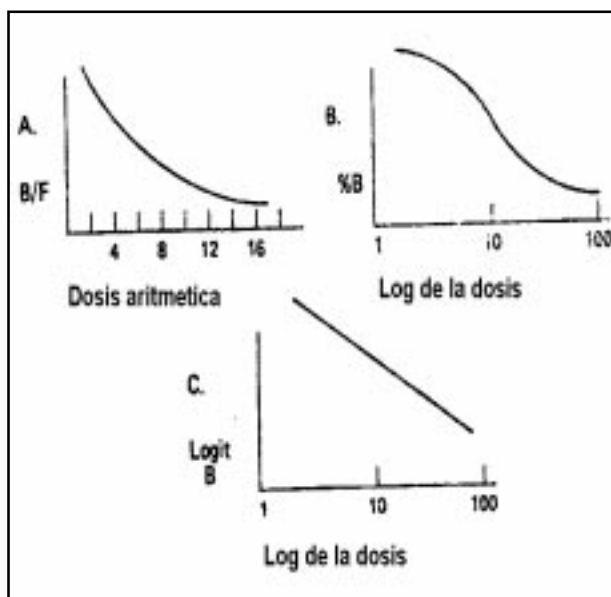


Figura N°V: Gráficos de datos.

fica en la ordenada de un papel logit y el logaritmo de la dosis en la abscisa. Esto produce una línea recta con una pendiente negativa que brinda una mayor cantidad de puntos en la región útil de la curva (Travis, 1979).

Los siguientes índices de unión son los más comúnmente usados:

$$B/F = \frac{\text{cpm de la fracción unida luego de la separación}}{\text{cpm de la fracción no unida (F) luego de la separación}}$$

$$B/T = \frac{\text{cpm unidas}}{\text{cpm totales originalmente pipeteadas en cada tubo}}$$

$$\% B \text{ (del total)} = B/T * 100$$

$$\% B_0 \text{ (de } B_0) = B/B_0 * 100$$

Alternativamente, las cpm unidas sin más modificaciones pueden ser graficadas vs la dosis cuando un radioisótopo se usa como marca.

En un ensayo teórico ideal, donde una sola especie de sitio de unión está disponible el cual une un ligando, un gráfico aritmético de B/F vs la concentración de B produce una línea recta simple llamada gráfico de Scatchard (Fig. N°VI).

Por definición la pendiente de este gráfico constituye la constante de afinidad K y su intercepción en la ordenada la máxima capacidad de unión (o concentración de sitios de unión) (Travis, 1979).

REACTIVOS

Se necesitan 3 reactivos específicos para realizar un IE. Para el caso del RIE es un Ag marcado, el Ag en concentración conocida (es-

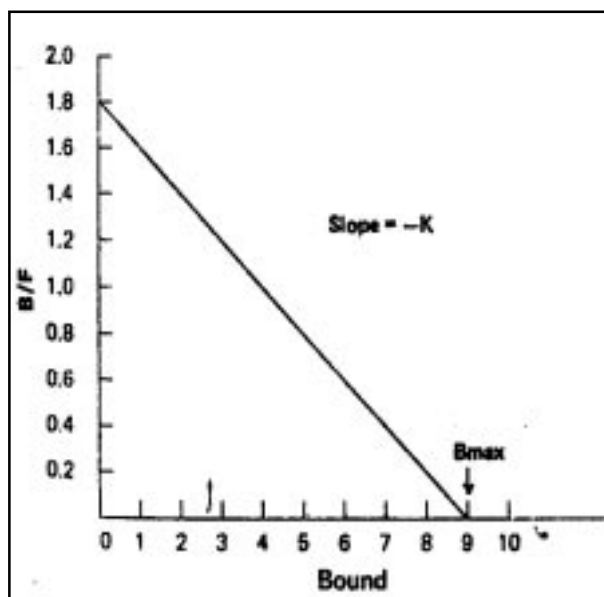


Figura N°VI: Gráfico de Scatchard. Slope: pendiente K Bound: unión

tándar de referencia) y un Ac específico capaz de reaccionar contra dicho Ag. También es necesario tener un método de separación entre la fracción unida al Ac y el Ag libre marcado.

Anticuerpo específico: Muchas de las hormonas peptídicas son satisfactoriamente inmunogénicas en una variedad de animales experimentales cuando la hormona se administra en una emulsión con el adyuvante de Freund. En lo referente a la generación de Ac, parece haber poca ventaja en inmunizar con Ag de alta pureza. Sin embargo, el Ag marcado, debe ser altamente purificado para evitar la interacción de contaminantes marcados con Ac no específicos.

A los péptidos de bajo peso molecular o las sustancias no peptídicas que no son antigénicas por si mismas (haptenos) se las une a proteínas de mayor peso molecular. Se puede emplear una variedad de métodos para unir las pequeñas moléculas a transportadores inmunogénicos. Como la presencia de otras reacciones inmunológicas no interfiere con la reacción entre el Ag marcado y su Ac específico, la inmunización con varios Ag no relacionados puede realizarse simultáneamente. La concentración, sensibilidad y especificidad de los Ac dirigidos a los distintos Ag parecen no estar relacionadas. Como la posibilidad de obtener un antisero satisfactorio aumenta con el número de animales inmunizados, la inmunización con múltiples Ag es ventajosa ya que reduce el número de animales para inmunizar y sangrar por un factor igual al número de Ag usados simultáneamente (Yallow, 1992). La concentración de Ac usualmente aumenta en las repetidas inmunizaciones, alcanzando una meseta después de 3 a 5 dosis de Ag. En ocasiones las concentra-

ciones de Ac pueden caer después de repetidas y regulares inmunizaciones. En estas ocasiones los animales deben tener un período libre de inmunizaciones de 3 a 6 meses, después del cual, la reinmunización resulta usualmente en una aumentada respuesta de Ac.

La producción de un antisuero satisfactorio resulta ser un arte impreciso más que una ciencia. No obstante haber numerosos trabajos que describen procedimientos especializados para la inmunización, no existe un acuerdo general con respecto a cuales son las especies animales más apropiadas o la técnica óptima para producir el mejor Ac para cada una de las diversas sustancias para las cuales se ha descrito un RIE. Una de las variables más importantes es la cantidad de Ag a inocular, ya que si es insuficiente se produce una desensibilización y si es muy alta se produce una parálisis inmunológica. Lamentablemente, la cantidad a inocular sigue siendo todavía una cuestión empírica.

Hay considerable interés en usar los Ac monoclonales para los RIE. Este método permite la producción de grandes cantidades de Ac monoespecífico. No obstante, la sensibilidad obtenida con el uso de tal Ac es generalmente menor que aquella obtenida por la propia selección entre Ac heterólogos producidos con la inmunización tradicional. La razón de esta diferencia es que la selección de Ac monoclonales generalmente produce reacciones que tienen constantes de equilibrio (K) intermedia entre aquellas con alta y con baja K (Yallow, 1992). Cuando se usa el antisuero ordinario heterólogo, éste está diluido suficientemente, de manera que sólo los sitios de unión del Ac con las más altas K, y por lo tanto la más alta sensibilidad, son capaces de unirse al Ag. Si no se requiere una máxima sensibilidad, el uso de Ac monoclonales puede ser ventajosa, ya que poseen mayor selectividad que los Ac heterólogos.

Antígeno marcado: Por su histórica predominancia como los marcadores de elección en los IE, los trazadores radiomarcados se toman como ejemplo. De todas maneras los conceptos básicos son válidos para cualquier tipo de marca usada. El primer paso en un IE es la preparación de un ligando altamente purificado que pueda ser radiomarcado sin pérdida de su capacidad de unión. El ligando radiomarcado en un RIE se denomina trazador.

Ciertas moléculas excepcionales como la tiroxina y la triiodotironina tiene I nativo en su estructura molecular y por lo tanto pueden incorporar radionúclidos de yodo emisores de rayos gamma (^{125}I o ^{131}I) sin alteración de su estructura molecular primaria. No obstante, las moléculas orgánicas normalmente presentes en los fluidos biológicos no tienen elementos en su

composición que puedan ser sustituidos por isótopos emisores radiactivos. Los radionúclidos emisores de rayos beta tales como el ^{14}C y el ^3H pueden ser usados para marcar estas moléculas pero las limitaciones de detección del contador de centelleo líquido les quita valor.

Aunque los radionúclidos emisores gamma, tales como ^{125}I o ^{131}I , tiene una vida media relativamente corta ($T^{1/2} = 60$ y 8,1 días respectivamente) son los isótopos de elección para usar en los IE. Esto se debe a su relativamente alta energía de emisión gamma que permite la unión al ligando con alta actividad específica y menor error de conteo. El ^{125}I tiene mayor vida media que el ^{131}I y es más conveniente para los ensayos clínicos y para el almacenamiento, que el ^{131}I de más corta vida. El ^{125}I y el ^{131}I son normalmente usados para marcar polipéptidos. El ^{125}I , tiene menor energía que el ^{131}I pero es el radionúclido más usado en radioiodinaciones. Los ligandos marcados con ^{125}I son técnicamente más convenientes que los marcados con emisores beta, por lo tanto es deseable que las sustancias no proteicas en muy bajas concentraciones como los esteroides, también sean marcados con emisores gamma. Algunas moléculas como los estrógenos contienen parte de la molécula a la cual puede ser directamente incorporado el ^{125}I sin manipulaciones químicas complicadas. Desafortunadamente como un átomo de I ejerce un efecto estérico grande en el esteroide, la incorporación del mismo distorsiona significativamente la molécula y altera su encaje geométrico con el sitio de unión al Ac, por lo que la inmunoreactividad es afectada. Es posible usar una molécula espaciadora para separar los sitios antigénicos del esteroide de la porción marcada. Más comúnmente, se utiliza la iodinación de conjugados proteicos, que pueden ser marcados con ^{125}I como cualquier otra proteína. En este caso, el radioyodo es incorporado en los residuos tirosil de la proteína conjugada (albúmina) y no en el mismo esteroide. Resulta de principal importancia que la inmunoreactividad entre marcadores y Ag no marcados por los sitios de unión al Ac sea semejante. Un método útil para iodinar moléculas no proteicas es conjugadas con derivados de ésteres de metiltirosina, ya que dicho éster puede incorporar I por las técnicas convencionales. Ejemplos de hormonas que han sido satisfactoriamente iodinadas son los esteroides: estrógenos, testosterona y cortisol (Travis, 1979). También se pueden usar hormonas tritiadas con la ventaja que la vida media del tritio es de 12 años y produce menores efectos estéricos.

El método más común para iodinar los ligandos es el método de Hunter, Greenwood, y Glover de la oxidación con metabisulfito de so-

dio y cloramina T. Otros métodos que han demostrado utilidad son el de la lactoperoxidasa (oxidación enzimática) y el de la iodinación en fase sólida con Iodógeno. Este último basado en la generación de la especie iodo electrofílico (I^+) a partir del NaI usando iodógeno como reactivo (Poskus, 1989).

Seguido a la reacción de iodinación se requiere la separación de los compuestos iodinados que no reaccionaron y de los compuestos dañados. Esto es usualmente llevado a cabo por filtración molecular en la resina Sephadex, DEAE celulosa, o cromatografía en celulosa. Después de la purificación, la fracción marcada que va a ser usada como trazador debe ser analizada por la presencia de material dañado, el cual puede interferir como unión no específica (UNE), y entonces aumentar el blanco del ensayo. Un alto blanco (UNE) reduce la confiabilidad, sensibilidad y precisión del ensayo. La estabilidad del ligando marcado es un importante factor en un IE. Las moléculas marcadas muestran estabilidad variable. Los polipéptidos pueden ser particularmente vulnerables al daño perdiendo su inmunoreactividad en diferente medida en la iodinación. La prolactina, por ejemplo, sufre un daño tal por la radiación que puede ser usada hasta 2 o 3 semanas luego de la iodinación. Típicamente la unión específica disminuye mientras que la no específica del material dañado aumenta con el tiempo de almacenamiento, resultando en una pérdida de sensibilidad y precisión. A veces la repurificación de los trazadores y la separación de los componentes dañados pueden prolongar la vida del ensayo. El conocimiento de la estabilidad de los trazadores y de las condiciones óptimas de almacenamiento son necesarias para el satisfactorio uso de esta metodología.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN LIBRE DE LA UNIDA

El clásico método inmunológico para separar la fracción unida al Ac del Ag libre consistía en la precipitación espontánea de los complejos Ag-Ac. No obstante, con el uso generalizado de los RIE de alta sensibilidad se requiere que la concentración molar de los reactivos sea tan baja que la precipitación espontánea no se produce y los complejos Ag-Ac permanecen solubles. Se han usado una amplia variedad de métodos para la separación:

- precipitación de complejo Ac-Ag con un segundo Ac dirigido contra el complejo (Método del doble Ac) o bien con proteína A (compuesto en suspensión que se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas),

- uso de solventes orgánicos o la precipitación salina para precipitar los complejos,

- adsorción de complejos al material de fase sólida y

- adsorción del Ag libre a material de fase sólida tal como celulosa, carbón activado, silicatos, o resinas de intercambio iónico (Poskus, 1989).

El método del doble Ac es el de elección en el desarrollo de nuevos procedimientos del RIE. No obstante, el costo del segundo Ac puede convertirlo en excesivamente caro cuando miles de muestras deben a ser analizadas. El método acuoso de polietilenglicol para la precipitación de los complejos puede ser usado luego de que un ensayo haya sido validado con la metodología del doble Ac.

La adsorción o la formación de complejos Ac-Ag en una fase sólida es un método generalmente aplicado en los kits comerciales ya que brinda una alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad; no obstante, presenta la limitación de su costo.

Para procedimientos rutinarios, generalmente se prefieren un método de adsorción del Ag libre al material de fase sólida, que es por otro lado el menos costoso. Ciertos principios comunes se aplican a todas las técnicas de adsorción de Ag. Una masa dada de adsorbente es usualmente más efectiva si el área total de superficie se aumenta, es decir, si las partículas adsorbentes se hacen más pequeñas. Entonces, cantidades en trazas tanto de Ac como de Ag libre pueden ser adsorbidas a materiales como celulosa, carbón activado o silicatos, a no ser que la concentración de proteínas plasmáticas u otra proteína en la mezcla de incubación sea suficientemente alta para saturar los sitios de unión a la gama globulina. Generalmente, los métodos de adsorción del Ag son más satisfactorios para los pequeños Ag, aquellos con peso molecular de 30.000 o menor. La mayor afinidad del adsorbente para sustancias de bajo peso molecular en presencia de proteínas plasmáticas permite su casi total adsorción incluso en la presencia de plasma virtualmente no diluido o de altas concentraciones de otras proteínas (Yallow, 1992).

El hecho de que un gran número de métodos de separación de Ac unidos a la hormona marcada hayan sido empleados es una consecuencia de la variedad de propiedades químicas de la gran cantidad de sustancias para las cuales se usa el RIE.

EQUIPOS DE DETECCIÓN

Por tratarse del equipo más frecuentemente empleado se reproduce un esquema de un contador de emisión gamma (Fig.Nº VII).

Para medir las radiaciones gamma se usan cristales de NaI envenenados con trazas

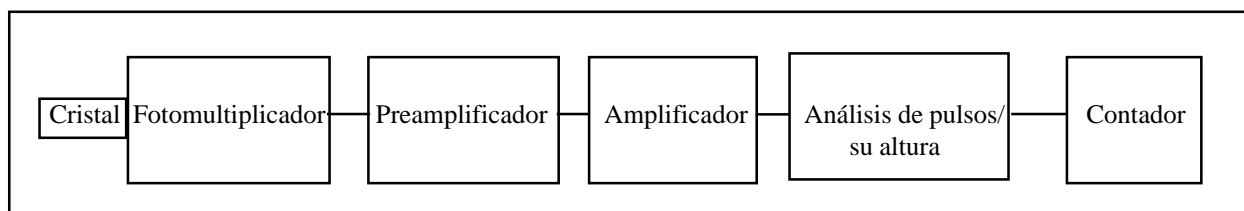


Figura N°VII: Esquema de un contador de radiaciones gamma

de Tl. Este le da la capacidad de centellar (emisión de fotones) a la temperatura ambiente cada vez que la radiación interacciona con él. Son cristales cilíndricos de 2,5 a 16,5 cm de diámetro y de 5 a 4,5 cm de espesor. Todas sus caras, menos una, están recubiertas por una capa de MgO, que actúa como reflejante, y otra, encima de la anterior, de aluminio. La cara libre se halla íntimamente adosada a un tubo fotomultiplicador. Dentro del cristal se produce una radiación lumínica llamada centelleo. Esta, en última instancia, sale del cristal por la cara unida al tubo fotomultiplicador. Esos centelleos se cuantifican al incidir sobre un fotocátodo que forma parte del tubo fotomultiplicador. Este posee unas placas denominadas dinodos, cada uno de estos presenta una diferencia de potencial determinada. Cuando incide un fotón gamma, en el fotocátodo salta un electrón (fotoelectrón) que penetra dentro del campo eléctrico del tubo fotomultiplicador. Por cada electrón que incide en el dinodo salta un número de electrones sucesivamente en el resto de los dinodos. El número de electrones que se liberaron en el ánodo será proporcional a la diferencia de potencial total, en la cual la base será el número de electrones arrancados del primer dinodo y el exponente, el número de dinodos. En este caso se transforma un efecto de la radiación gamma en un pulso eléctrico de determinada altura.

Estos pulsos son proporcionales a la energía que incide en el cristal, es decir que a mayor energía mayor altura del pulso. Esta proporcionalidad ocurre realmente si la energía gamma que incide, penetra, interacciona y deja toda su energía dentro del cristal. En este caso se ha producido una absorción total. Puede suceder que se escape la energía dentro del cristal, entonces ocurre una absorción parcial, y el pulso obtenido, no será tan alto como en el caso anterior. Ampliando este concepto se tendrá que: a mayor energía habrá mayor altura del pulso y por lo tanto mayor absorción total. La altura del pulso está condicionada por una determinada tensión: a mayor tensión en el tubo fotomultiplicador, mayor energía de los electrones y mayor altura del pulso. El flujo de electrones incidentes en el tubo fotomultiplicador también depende del tipo y masa de nuclido.

Para seleccionar la altura del pulso que interesa detectar se emplea un colimador lla-

mado discriminador de altura de pulso. Este es un aparato electrónico que permite discriminar alturas de pulso para seleccionar solo el nuclido que se desea detectar. Solo cuentan aquellos pulsos que terminen dentro de la ventana y no los que lo hagan fuera de ella. Esto se produce en el módulo análisis de pulsos. Cada pulso representa una desintegración atómica del radioisótopo emisor gamma específico (Iovine y Selva, 1985).

CONTROL DE CALIDAD DEL RIE

Todo estudio cuantitativo debe reunir una serie de requisitos que indican la confiabilidad que merecen sus resultados y la posibilidad de practicarlo. Algunos parámetros básicos que hacen al estudio de la calidad de un ensayo son:

-Exactitud: es la mayor proximidad con la que un método analítico se aproxima al verdadero valor de la muestra. Esto puede llevarse a cabo por procedimientos de recuperación después del añadido de cantidades conocidas de la sustancia investigada. Se puede expresar como el porcentaje de la cantidad de la sustancia añadida que se logre cuantificar. Para muchas hormonas se dispone además de patrones internacionales cuya concentración se acepta como verdadera.

-Precisión: es la reproducibilidad de las mediciones sobre una misma muestra. Un ensayo puede ser exacto pero no preciso.

-Varianza inter-ensayo (precisión): variación de múltiples determinaciones de la misma muestra en distintos ensayos.

-Varianza intra-ensayo: variación en las múltiples determinaciones de la misma corrida de muestras en el mismo ensayo.

-Coeficiente de variación (CV): es un índice muy útil de precisión interensayo, un buen CV se encuentra entre 5-10%.

$$CV = \frac{SD \cdot 100}{x}$$

Donde SD es el desvío standard y x la media.

-Variación interoperario: consiste en el CV obtenido de múltiples ensayos realizados por distintos operadores.

-Especificidad: es la determinación de una sustancia con exclusión de otras. Las muestras

biológicas son complejas cualitativa y cuantitativamente en relación a sus componentes. Si bien interesa cuantificar uno de estos componentes el resto puede interferir. Dicha interferencia puede ser inespecífica y se llama efecto matriz (tonicidad, temperatura, sustancias extrañas) o específica debida a la heterogeneidad de los Ag, del antisuero o al hecho de que distintos Ag comparten grupos inmunológicos. La reactividad cruzada se puede determinar efectuando distintas curvas con la sustancia en estudio y aquellas otras sospechosas de compartir propiedades antigénicas. La falta de paralelismo de las curvas indica que las sustancias no son inmunológicamente similares. Para eliminar la inmunidad cruzada se debe disponer del antisuero con mayor afinidad por la molécula a medir.

-Sensibilidad: es la menor cantidad de Ag que puede ser detectada con certeza estadística. Puede ser apreciada en función de la pendiente de la curva, cuanto mayor sea esta mayor será la sensibilidad. Para aumentar la sensibilidad se puede aumentar la dilución del antisuero; la dilución aconsejable es aquella que fija un 50% del trazador en ausencia del Ag no marcado.

-Reproducibilidad: los resultados serán reproducibles dependiendo de la capacidad técnica del grupo de trabajo. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de trabajo se las debe mantener constantes para todos los ensayos.

-Practicabilidad: es la facilidad de realización de un análisis (Libertum, 1980).

La adhesión a rígidos estándares de control de calidad es un requisito para la satisfactoria realización de los IE. Ciertas pautas deben ser conocidas y seguidas:

-Actividad específica (A.S.) del trazador: la cantidad total de actividad relativa a la masa debe ser conocida para cada ensayo. En conjunción con esto, la inclusión de un blanco o no específico (UNE) en cada ensayo ayudará a monitorear la estabilidad y el decaimiento del ligando marcado.

-%B₀ (del total): es el porcentaje de las cuentas totales (T) encontradas en ausencia de ligando no marcado.

$$\% B_0 = \frac{B_0}{T} * 100$$

-50% B / B₀: es la cantidad conocida de ligando no marcado (estándar) que produce un valor de B igual al 50% B₀, es decir permite la unión del 50% del trazador al Ac (Travis, 1979; Bianchi y Marpes, 1982).

ENSAYOS INMUNORADIOMÉTRICOS

Como alternativa para los ensayos de saturación de equilibrio donde se produce una competición entre el ligando marcado y el no marcado por un limitado número de sitios de unión, quedando algo del ligando "desconocido" sin reaccionar (no unido), existe otra técnica en la cual todo el Ag desconocido reacciona con un exceso de Ac marcado (Figura N° VIII).

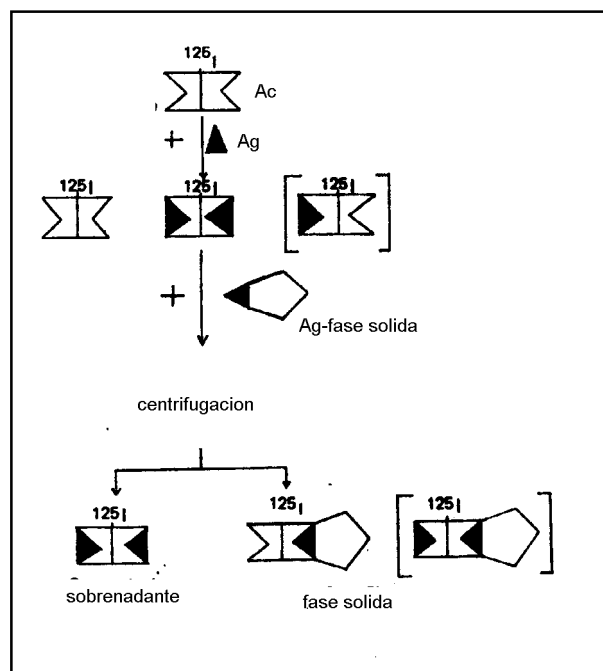


Figura N°VIII: Método inmunoradiométrico

Esta última técnica se llama inmunométrica. En teoría como todo el Ag desconocido ha formado complejos con el Ac marcado, el Ag es directamente detectable con este método, por eso se obtiene mayor sensibilidad que con los métodos convencionales de equilibrio (Hage, 1993).

INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS

Probablemente el desarrollo más significativo en IE en los últimos años ha sido la sustitución de los radioisótopos por enzimas. En diferentes variaciones de esta técnica tanto el Ag, el Ac primario, o incluso el segundo Ac pueden ser marcados enzimáticamente. En los enzimo-inmunoensayos (EIE) homogéneos, no es necesaria una separación física de la fracción unida de la libre. También el Ag marcado con la enzima y el Ag no marcado (analito) compiten por un número limitado de sitios de unión al Ac. El marcador enzimático puede estar inactivo o contrariamente tornarse activo cuando se une al Ac. El cambio en la actividad enzimática

tica, evidenciado por la adición de un sustrato cromogénico y expresado en variaciones de absorbancia a una determinada longitud de onda (Δ Abs), es función del marcador enzimático unido. En la figura 9 se gráfica un ejemplo de un EIE homogéneo donde la molécula marcada enzimáticamente se une al Ac específico, apareciendo su actividad enzimática (Tijssen, 1985) (Figura N° IX).

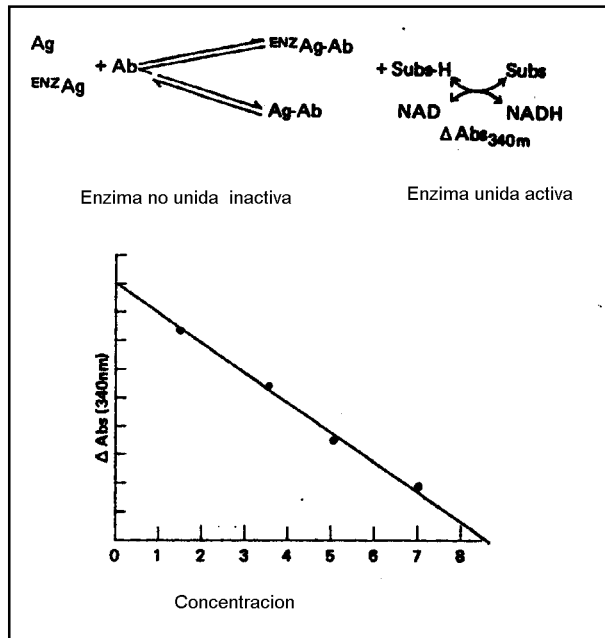


Figura N°IX: Enzimoinmunoensayo homogéneo

Una segunda categoría de los EIE esta representada por el ELISA, donde los inmunoreactantes están inmovilizados en soportes de fase sólida y tanto el Ag, el Ac primario, el segundo Ac pueden estar marcados con la enzima (Nieto y Carbonetto, 1989).

Los EIE tienen la ventaja de poder ser realizados en forma inmediata en un laboratorio convencional químico, ya que no requieren personal especialmente entrenado, precauciones del manejo de radioactivos ni equipos caros de detección. No obstante, los EIE no tienen la misma aplicabilidad para medir moléculas grandes como la de las hormonas polipeptídicas. Uno de los principales problemas potenciales el impedimento estérico en los sitios de unión a la enzima cuando moléculas grandes se unen a las enzimas. La sensibilidad de los EIE puede no ser suficiente para medir concentraciones extremadamente bajas en las cuales algunas hormonas polipeptídicas circulan; además la medición de la actividad enzimática está sujeta a factores medioambientales (pH, temperatura, etc) en adición a la interferencia de estos a la reacción Ag-Ac (Tijssen, 1985).

FLUOROINMUNOENSAYO

El fluoroinmunoensayo (FIA) emplea los mismos principios comunes descriptos, usando un marcador fluorescente sobre la molécula marcadora (Ag, Ac, o segundo Ac). Los ensayos pueden ser competitivos o no y después de la separación de la fracción unida de la libre la cuantificación se realiza con técnicas fluorométricas. Se incluyen también en esta categoría los ensayos inmunofluorométricos (IFMA) y los IE basados en la polarización fluorescente (Hage, 1993).

DETERMINACIONES HORMONALES EN CANINOS DOMÉSTICOS

En este apartado de describen brevemente algunos de los IE disponibles, en la actualidad, para las determinaciones hormonales en los caninos domésticos:

-Ensayo inmunoenzimométrico para prolactina canina:

Aunque la prolactina canina (cPrl) puede medirse por RIE (Graff et al, 1977; De Coster et al, 1983), comercialmente la determinación que se ofrece es un ensayo inmunoenzimométrico (EIEM) (Fig. N° X).

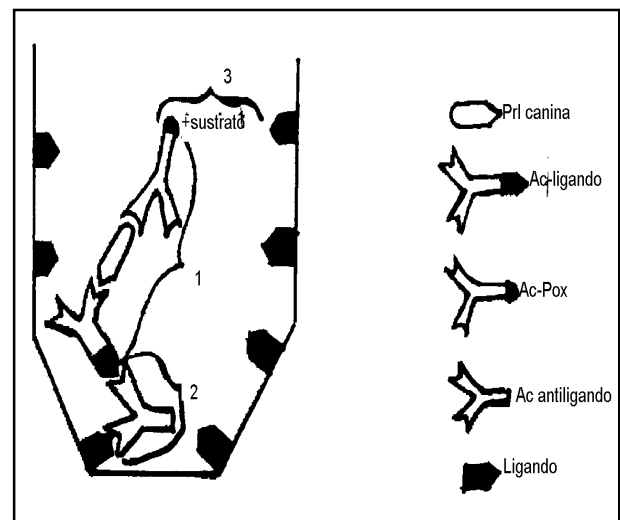


Figura N°X: Etapas de EIEM de prolactina canina

En este procedimiento se incubaba la muestra, en microplacas, con cantidades saturantes de dos Ac anti cPrl; uno de ellos está unido a un ligando de bajo peso molecular; el segundo Ac está conjugado a la peroxidasa de rábano

rústico. Una vez completada la primera fase de incubación, virtualmente toda la cPrl de la muestra está unida a ambos Ac lo que la asocia a una molécula de peroxidasa y a una de ligando. En la segunda fase de incubación se agrega un Ac antiligando. Como los pocillos de la microplaca están recubiertos con ligando, el Ac antiligando, actuando como puente, se une por una valencia al ligando asociado a la cPrl y por su otro sitio de unión al ligando unido a la pared del pocillo. Esto da como resultado final que todo el complejo peroxidasa- cPrl quede unido a la pared del pocillo. Lavando se eliminan los reactivos en exceso, procediéndose luego a agregar un sustrato incoloro de la peroxidasa (3, 3',5, 5' tetrametilbenzidamina, TMB) que será transformado por la enzima en un compuesto coloreado. La intensidad del color desarrollado será proporcional a la cantidad de peroxidasa unida a la pared del pocillo, la cual a su vez es proporcional a la cantidad de cPrl existente en la muestra a evaluar.

Los valores de cPrl hallados con este EIEM se encuentran entre 0,5 y 80 ng/ml con una media de 17,9 ng/ml, datos concordantes con los de algunos RIE citados en la bibliografía (De Coster et al, 1983; Graf, 1978; Hoppen et al, 1993, Knight et al, 1976 y 1977; Reimers et al, 1978).

-Radioinmunoensayo para tiroxina canina:

Para la determinación de tiroxina canina (cT_4) se usa RIE de fase sólida con ^{125}I . La $c^{125}I T_4$ compite por un tiempo fijo con la cT_4 de la muestra por los sitios del Ac unidos a la pared del tubo, en presencia de agentes bloqueantes para las proteínas de unión para la hormona tiroidea. Por último, los tubos son decantados y llevados al contador gamma. La concentración de cT_4 se lee interpolando en la curva de calibración.

Nuestros valores de referencia con este kit varían entre 0,8 y 2,9 $\mu g/dl$, los cuales resultan coincidentes con aquellos mencionados en la bibliografía (Belshaw et al, 1979; Gaschen et al, 1993; Kaufman et al, 1985, Reimers et al, 1991)

-Radioinmunoensayo para progesterona canina:

Para la determinación de progesterona (P_4) se usa también un RIE de fase sólida con ^{125}I . De igual manera que para la cT_4 , la $^{125}I P_4$ compite con la de la muestra por el Ac, el que está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno. La simple decantación del sobrenadante es suficiente para finalizar la reacción de competencia y aislar la fracción unida al Ac de la P_4 marcada. Los tubos son llevados, entonces, al contador gamma y se procede de igual manera a la descripta para la cT_4 .

El rango de valores de nuestro laboratorio con este RIE se extiende de 0,2 a 80 ng/ml, dependiendo, en el caso de las hembras, del momento de ciclo estral en que se encuentren (Concannon et al, 1989; Feldman y Nelson; 1996, Kubasic, 1984, Olson et al, 1984).

DISCUSIÓN SOBRE LAS DETERMINACIONES HORMONALES EN LA ENDOCRINOLOGÍA CLÍNICA CANINA

Lamentablemente en nuestro medio, no hay una aplicación rutinaria de los IE en la endocrinología clínica canina. Esto podría explicarse por la ausencia de laboratorios, suficientemente equipados, dispuestos a poner a punto estas técnicas para pequeños animales. Esta situación obliga a aquellos veterinarios desearios de arribar al diagnóstico definitivo de determinadas endocrinopatías a recurrir a laboratorios de medicina humana, los que no siempre proveen resultados aceptables debido a las diferencias moleculares y de rangos hormonales entre las distintas especies.

Las determinaciones hormonales, sin diferir en su costo de otros estudios complementarios, permiten al profesional identificar el origen primario de múltiples signos clínicos, los que sin su aplicación son insuficientemente tratados sintomáticamente. Por último, el hecho de contar con valores hormonales evita la realización de pruebas terapéuticas que suelen conducir a diagnósticos erróneos o bien provocar efectos indeseables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Belshaw; Rijnberk, B.E.; Rijnberk, A. Radioimmunoassay of plasma T4 and T3 in the diagnosis of primary hypothyroidism in dogs. *J Am Animal Hosp Assoc* 1979; 15:17-23
2. Bianchi, R.A.; Marpes, S. Aspectos estadísticos de los ensayos diagnósticos in vitro. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1982; 16,1:45-80
3. Concannon, P.W.; Lein, D.H. Hormonal and Clinical Correlates of Ovarian Cycles, Ovulation, Pseudopregnancy, and Pregnancy in dogs. En: Kirk, R.W. (ed). *Current Veterinary Therapy X*. W.B. Saunders, Philadelphia. (USA). 1989; p.1269-1282
4. De Coster, R; Beckers, J.F. Beerens, D. A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: Plasma levels during the reproductive cycle. *Acta Endocrinol* 1983; 109:473-8
5. Eduards, R. Radioimmunoassay. En: Hutton, J.C.; Siddle, K. (eds.): *Peptide hormone Secretion*. Oxford University Press. Oxford. (England) 1990; p. 71-95
6. Feldman, E.C.; Nelson, R.W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* 2nd. ed. W.B. Saunders, Philadelphia (USA) 1996
7. Gaschen, F; Thomposon, J; Beale, K. Recognition of triiodothyronine-containing epitopes in canine thyroglobulin by circulating thyroglobulin autoantibodies. *Am J Vet Res* 1993; 54,2:244-7
8. Graf, K. J.; Friedeich, E; Mattes, S; Hasan, S.H. Homologous Radioimmunoassay for canine prolactin and its application in various physiological states. *J Endocr* 1977; 75:93-103.
9. Graf, K.J. Serum oestrogens, progesterone, prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fert* 1978; 52:9-14
10. Hage, D.S. Immunoassays. *Analytical Chemistry*. 1993; 65,12:420-4
11. Hoppen, H.O.; Grumau, B.; Hayer, M. Prolactin in canine reproduction: normal values under various conditions . *Proceedings. Advances in Veterinary Endocrinology*. Berlin. 18.9. 1993
12. Iovine, E; Selva, A.A. *El Laboratorio en la Clínica*. 3ra ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 1985
13. Kaufman, J. Olson, Pn.; Reimers, T.j.; Allen T.A. Serum concentrations of T4, T3, TSH and PRL in dogs before and after TRH administration. *J Vet Res* 1985; 46,2:486-92
14. Knight, P.J.; Gronow, M; Hamilton, J.M . Purification of canine prolactin by preparative isotachoresis. *J Endocrinol* 1976; 69:127-32
15. Knight, P.J.; Hamilton, J.M.; Scanes, C.G. Homologous radioimmunoassay for canine prolactin. *Acta Endocrinol* 1977; 85:736-43
16. Knight, P.J.; Hamilton, J.M. Serum prolactin during pregnancy and lactation in the beagle bitch. *Vet Rec* 1977; 101:202-3
17. Kubasic, N.P. Evaluation of a direct solid phase radioimmunoassay of progesterone. *Clin Chem* 1984; 30:284-6
18. Libertun, C. *Radioinmunoanálisis*. Libreros ed. Buenos Aires 1980
19. Nieto, A. Carbonetto, C.H. *Enzimoinmunoensayo*. En: Margni, R.A. *Inmunología e inmunoquímica* 4ta ed. Panamericana. Buenos Aires. 1989 p 571-86
20. Olson, P.N.; Bowen, R.A.; Behrendt, M.D. Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am J Vet Res* 1984; 45:149-53
21. Poskus, E. *Radioinmunoensayo*. En: Margni, R.A. *Inmunología e inmunoquímica* 4ta ed. Panamericana . Buenos Aires. 1989 p 587-614
22. Reimers, Y.J.; Lawler, D.f.; Sutariora, P.M., Correa, M.T. Effects of age, sex and body size on serum concentration of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *Am J Vet Res* 1991; 51,3:1489-91
23. Reimers, T.J; Phemister, R.D; Niswender, G.D. Radioimmunological measurement of FSH and Prolactin in the dog. *Biol Reprod* 1978; 19:673-9
24. Tijssen, P. *Practice and Theory of Enzymoimmunoassays*. Burdon, R.H., Knippenberg, P.H. (Ed). Elsevier Science Publishers. Amsterdam 1985
25. Travis, J.C. *Fundamentals of RIA*. Scientific Newsletters Inc. California (USA) 1979
26. Yalow, R.S. Radioimmunoassay of hormones. En: Wilson, J.D.; Foster, D.W. (eds). *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.(USA) 1992 p 23-131